

© EPDOC / EPO

PN - JP11344460 A 19991214  
PD - 1999-12-14  
PR - JP19980153141 19980602  
OPD - 1998-06-02  
TI - METHOD FOR EVALUATING LIQUID AND CULTURE MEDIUM  
IN - NANKAI SHIRO; MIYASHITA MARIKO; YOSHIOKA TOSHIHIKO  
PA - MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD  
IC - G01N27/327

© WPI / DERWENT

TI - Glucose and lactic acid density measuring method for evaluating brewing foodstuff like sake - involves measuring electron acceptor reduction in **enzyme** reaction to measure density of glucose and lactic acid in sample liquid

PR - JP19980153141 19980602

PN - JP11344460 A 19991214 DW200015 G01N27/327 005pp

PA - (MATU ) MATSUSHITA DENKI SANGYO KK

IC - G01N27/327

AB - JP11344460 NOVELTY - The sample liquid is applied to the glucose reaction reagent layer and the lactic acid reaction reagent layers formed on the substrate (1). The electron acceptor reduction by **enzyme** reaction is measured electrochemically. The glucose and lactic acid in sample liquid are measured from measure electron acceptor reduction. DETAILED DESCRIPTION - The electrodes (9,10) are formed on the substrate.

- USE - For measuring glucose and lactic acid density simultaneously in evaluating brewing foodstuff like sake.

- ADVANTAGE - Enables easy measurement of glucose and lactic acid in liquid whose composition changes rapidly. Simplifies precise evaluation of culture medium. DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the disassembled isometric view of biosensor. (1) Substrate.

- (Dwg.1/6)

OPD - 1998-06-02

AN - 2000-163938 [15]

© PAJ / JPO

PN - JP11344460 A 19991214

PD - 1999-12-14

AP - JP19980153141 19980602

IN - MIYASHITA MARIKO; YOSHIOKA TOSHIHIKO; NANKAI SHIRO

PA - MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

TI - METHOD FOR EVALUATING LIQUID AND CULTURE MEDIUM

AB - PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method by which a solution containing glucose and lactic acid in a sample solution to be inspected can be evaluated by quickly determining the solution through simple operation by using a biosensor having two reactive reagent layers, one of which contains an **enzyme** having a glucose oxidizing ability and the other of which contains another **enzyme** having a lactic acid oxidizing ability.

**BEST AVAILABLE COPY**

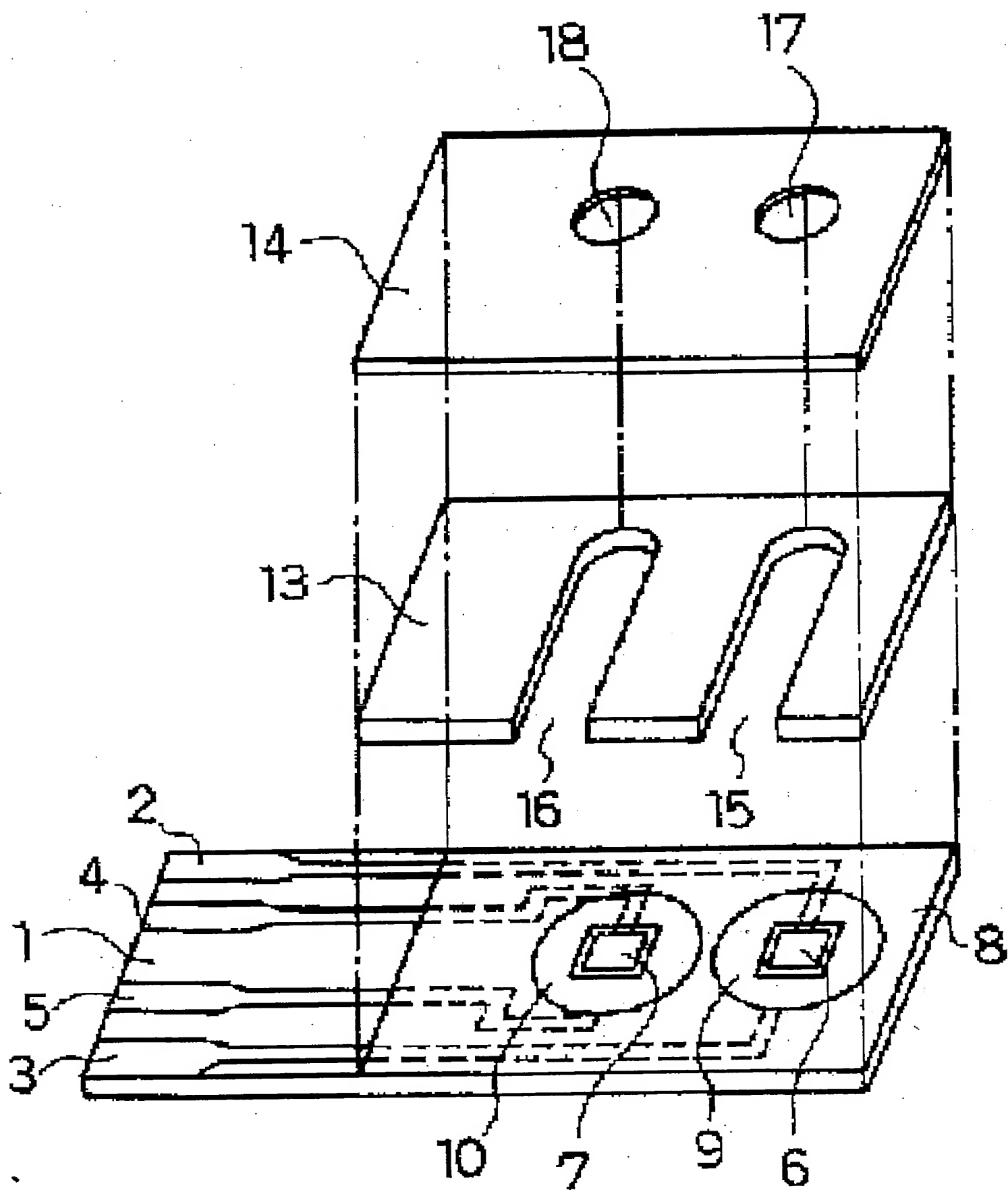
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- SOLUTION: Measuring electrodes 6 and 7 and counter electrodes 9 and 10 are formed respectively in contact with leads 2 and 4 and leads 3 and 5 on one surface of an insulating substrate 1. A biosensor is manufactured by sticking a cover 14 provided with a spacer 13 and air holes 17 and 18 to the substrate 1. A sample solution to be inspected is easily introduced to the sensor through simple operation by only bringing the solution into contact with sample solution inlets 15 and 16 by the **capillary** phenomenon of the space section formed of the cover 14 and spacer 13. In the meantime, a reactive reagent layer containing glucose oxidase as an **enzyme** and another reactive reagent layer containing lactate oxidase as an **enzyme** are respectively formed on the electrode systems composed of the measuring electrode 6 and the counter electrode 9 and the measuring electrode 7 and the counter electrode 10.

I - G01N27/327

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-344460

(43) 公開日 平成11年(1999)12月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 27/327

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-153141

(22) 出願日 平成10年(1998) 6 月 2 日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社  
大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 宮下 万里子

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

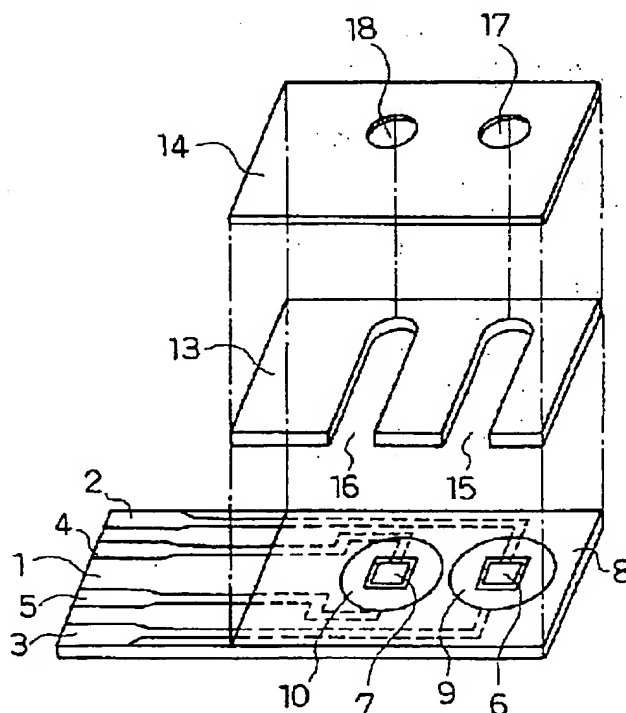
(74) 代理人 弁理士 石井 和郎

(54) 【発明の名称】 液体および培地の評価法

(57) 【要約】

【課題】 被検試料液中の複数の成分、特にグルコースと乳酸を含む溶液を簡易な操作で迅速に定量して、被検試料液を評価する方法を提供する。

【解決手段】 絶縁性の基板上に形成された2組の電極系、グルコース酸化能を有する酵素を含む反応試薬層および乳酸酸化能を有する酵素を含む反応試薬層を具備するバイオセンサを用い、被検試料液を前記2つの反応試薬層に供給して前記被検試料液と前記酵素を電子受容体の存在下で反応させる工程、および前記酵素反応に伴って還元された電子受容体を電気化学的に測定する工程を含み、被検試料液中のグルコースおよび乳酸をそれぞれ定量して液体を評価する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 絶縁性の基板、前記基板の同一面上または異なる面上に形成された2組の電極系、および前記2組の電極系上にそれぞれ形成された2つの反応試薬層からなり、前記反応試薬層の一方が少なくともグルコース酸化能を有する酵素を含み、前記反応試薬層の他方が少なくとも乳酸酸化能を有する酵素を含むバイオセンサを用い、被検試料液を前記2つの反応試薬層に供給して前記被検試料液と前記酵素を電子受容体の存在下で反応させる工程、および前記酵素反応に伴って還元された電子受容体を電気化学的に測定する工程を含み、被検試料液中のグルコースおよび乳酸の濃度をそれぞれ定量することを特徴とする液体の評価法。

【請求項2】 培養の進行に伴って、グルコースを飼料とし、乳酸が生産される培地を請求項1記載の液体の評価法を用いて評価する培地の評価法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検試料液中の二つの特定成分を同時に定量して、迅速かつ高精度に被検試料液を評価する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、液体中の特定成分を評価する方法として、ガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーを利用する方法、または酵素を利用する方法が知られている。酵素を利用する方法には、酵素反応に伴って変化する色素を反応系に共存させ、この色素を発色させて分光学的に測定する方法と、酵素反応に伴って還元される物質を反応系に含ませ、その還元された物質の量を電気化学的に測定する方法がある。

【0003】例えば、酵素と発色試薬を用いて試料液中のグルコースを測定する方法について、和光純薬工業(株)から「グルコースB-テストワコー」の商品名で販売されているセットを用いて説明する。まず、発色試薬液として、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよび4-アミノアンチピリンを含む発色剤を緩衝液に溶解させたものを調製する。次に、2種類のグルコース標準液(200mg/dlおよび500mg/dl)を適当に希釈して、5から6種類の濃度のグルコース溶液を調製する。

【0004】そして、調製したグルコース溶液0.02mlに、発色試薬液3.0mlをよく混合し、37℃で20分間加温した後、この混合溶液の505nmにおける吸光度をそれぞれ測定する。同様にして、種々の濃度のグルコース溶液に対する吸光度を測定し、横軸にグルコース濃度、縦軸に吸光度をプロットして検量線を得る。被検試料液の測定は、グルコース溶液の代わりに、被検試料液0.02mlを用い、上記と同様にして、505nmにおける吸光度を測定する。そして、先に求めた検量線から、被検試料液中のグルコース濃度を算出す

る。

【0005】また、酵素と発色試薬を用いて試料液中のL-乳酸を測定する方法について、ベーリンガー・マンハイム(株)から「F-キット L-乳酸製」の商品名で販売されているセットを用いて説明する。まず、L-グルタミン酸の緩衝溶液1.00ml、ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド溶液0.20ml、蒸留水1.00mlおよびグルタミン酸-ピルビン酸アミノ基転移酵素溶液0.02mlを混合して混合溶液を調製する。そして、混合5分後の340nmにおける吸光度を測定する。続いて、L-乳酸脱水素酵素溶液0.02mlを加え、20分間反応させた後、吸光度を測定する。このとき得られた吸光度と最初に測定した吸光度の差を求めブランク値とする。

【0006】被検試料液の測定は、まず上記と同様にして混合溶液を調製し、この混合溶液に被検試料液0.10mlを加えて混合する。そして、混合5分後の340nmにおける吸光度を測定する。続いて、L-乳酸脱水素酵素溶液0.02mlを加え、20分後の吸光度を測定する。このとき得られた吸光度と、先に求めたブランク値、および吸光度係数などの定数からL-乳酸の濃度を測定する。

【0007】また、電気化学的な方法で試料液中に特定成分を測定するには、例えば、特公平7-114705号公報に開示されているバイオセンサを用いる方法がある。図5は、このバイオセンサの一例を示す平面図である。また、図6は、図5の縦断面図である。絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法で測定極19、対極20および参照極21からなる電極系を形成する。次に、絶縁層8を形成して各電極の露出面積を一定にした後に、上記電極系上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体からなる反応試薬層22を形成したものである。

【0008】このようにして作製されたバイオセンサの反応試薬層上に、基質を含む試料液を滴下すると、反応試薬層が溶解して酵素と基質が反応し、これに伴い電子受容体が還元される。酵素反応終了後、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値と予め測定装置に記憶されている検量線に基づいて被検試料液中の基質濃度が算出される。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーおよび発色試薬を用いる酵素法によって被検試料液中の特定成分を定量するには、測定する試料液の量を正確にする必要があり、また、測定時間には少なくとも数分から数十分要するため、簡便性に欠けていた。さらに、いずれの測定方法においても高価な測定装置が必要であった。また、培地の特定成分を測定するには、汚過、除菌といった前処理が必要であり、操作が煩雑であった。

【0010】バイオセンサを用いる場合は、簡易な操作



で高精度な測定が可能であるが、複数の特性成分の濃度を同時に測定するには、それぞれを測定するバイオセンサが必要となり、手技が煩雑であった。本発明は、上記課題を鑑み、被検試料液中の複数の成分、特にグルコースと乳酸を含む溶液を簡易な操作で迅速に定量して、被検試料液を評価する方法を提供することを目的とする。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明による液体の評価法は、絶縁性の基板、前記基板の同一面上または異なる面上に形成された2組の電極系、および前記2組の電極系上にそれぞれ形成された2つの反応試薬層からなり、前記反応試薬層の一方が少なくともグルコース酸化能を有する酵素を含み、前記反応試薬層の他方が少なくとも乳酸酸化能を有する酵素を含むバイオセンサを用い、被検試料液を前記2つの反応試薬層に供給して前記被検試料液と前記酵素を電子受容体の存在下で反応させる工程、および前記酵素反応に伴って還元された電子受容体を電気化学的に測定する工程を含み、被検試料液中グルコースおよび乳酸をそれぞれ定量することを特徴とする。

#### 【0012】

【発明の実施の形態】本発明に用いるバイオセンサは、少なくとも測定極と対極からなる電極系2組を絶縁性の基板の同一面上、または異なる面上に形成し、それぞれの電極系上に少なくとも酸化還元酵素を含む反応試薬層を形成したものである。一つの反応試薬層には、グルコース酸化能を有する酵素、もう一つの反応試薬層には、乳酸酸化能を有する酵素を含ませることによって、被検試料液中のグルコースおよび乳酸が一つのバイオセンサで精度よく定量することができる。電子受容体には、フェリシアン化イオン、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、フェロセンなど水溶性で、酵素-電極間の電子移動を媒介しうる化合物を任意に使用できる。

【0013】このようにして作製されたバイオセンサの2つの反応試薬層に、グルコースおよび乳酸を含む被検試料液を含浸させると、グルコース酸化能を有する酵素を含むグルコース反応試薬層ではグルコースが、乳酸酸化能を有する酵素を含む乳酸反応試薬層では乳酸がそれぞれ反応し、この酵素反応に伴ってそれぞれの反応試薬層に含まれる電子受容体が還元される。そして、グルコース反応試薬層下の電極系および乳酸反応試薬層下の電極系によって、それぞれの酵素反応に伴って還元された電子受容体を酸化し、このとき得られる酸化電流値と、測定装置に記憶させておいた濃度-電流値の検量線の基づいて、被検試料液中のグルコースの濃度と乳酸の濃度を算出する。このようにして、被検試料液中のグルコースおよび乳酸の定量ができるため、被検試料液の成分組成を迅速に評価することが可能となる。

【0014】被検試料液として好適なものには、日本酒や醤油などのグルコースおよびL-乳酸を含む醸造食品

が挙げられる。醸造食品において、グルコースは発酵の原料であり、甘味の成分である。またL-乳酸は、味に影響する重要な成分である。このような醸造食品は、時間の経過とともに成分の組成が変化するため、醸造食品中の2つの成分を同時に迅速、簡易、および高精度に定量することは、品質評価をおこなう上で重要である。また、乳酸菌等の菌を培養する液体培地の状態の評価に本発明を用いると、迅速、簡易および高精度に、培地中のグルコースおよびL-乳酸の定量が可能となり、培養の進行度合いを評価したり、栄養源の補給の必要性の有無などを判断できたりして都合がよい。

#### 【0015】

【実施例】以下に、具体的な実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。図1は、本発明による液体の評価法の一実施例として用いたバイオセンサの反応試薬層を除いた分解斜視図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1の片面に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3、4、5を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを用いて測定極6および7を形成した。測定極6はリード2、測定極7はリード4とそれぞれ接触している。次に、絶縁性ペーストを用いて絶縁層8を形成した。絶縁層8は測定極6、7の露出部分の面積を一定とし、かつリード部2、3、4、5を部分的に覆っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3、5と接触するように印刷して対極9、10を形成した。

【0016】このようにして電極系を形成した絶縁性基板1に、スペーサー13と、空気孔17と18を備えたカバー14とを、図1中一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製する。カバーおよびスペーサーに高分子など透明な材料を用いると、反応試薬層の状態や被検試料液の導入状況を外部から容易に確認することが可能である。また、カバーを装着するとカバーとスペーサーによって出来る空間部の毛細管現象によって、被検試料液は試料液供給口15、16に接触させるだけの簡易操作で容易にセンサ内に導入される。

【0017】図2は、図1のバイオセンサのスペーサーとカバーを除いた縦断面図である。図1と同様にして、絶縁性基板1上に電極系を形成し、測定極6、対極9からなる電極系上に電子受容体としてフェリシアン化カリウムを含み、酵素としてグルコースオキシダーゼを含む溶液を滴下し、乾燥して、反応試薬層11を形成している。また、測定極7、対極10からなる電極系上に電子受容体としてフェリシアン化カリウムを含み、酵素としてラクテートオキシダーゼを含む溶液を滴下し、乾燥させて反応試薬層12を形成している。被検試料液のセンサ内への供給を円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液を試料液供給口15、16から反応試薬層にわたる部位に展開し、乾燥させてレシチン層を形成してもよ

い。

【0018】図3は、本発明の液体の評価法の他の実施例として用いたバイオセンサの反応試薬層を除いた分解斜視図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1の表面に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを用いて測定極6を形成した。測定極6はリード2と接触している。次に、絶縁性ペーストを用いて絶縁層8を形成した。絶縁層8は測定極6の露出部分の面積を一定とし、かつリード部2、3を部分的に覆っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように印刷して対極9を形成している。また、基板1の裏面に、表面と同様にして、リード4、5と、測定極7、絶縁層8、および対極10を形成している。このようにして電極系を形成した絶縁性基板1に、空気孔17または18を備えたカバー14、および2つのスペーサー13を、図3中一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製する。

【0019】図4は、図3のバイオセンサの縦断面図である。図3と同様にして、絶縁性基板1の表裏面上に電極系を形成している。そして、図2と同様にして、測定極6、対極9からなる電極系上にフェリシアン化カリウムとグルコースオキシダーゼを含む反応試薬層11を形成し、測定極7、対極10からなる電極系上にフェリシアン化カリウムとラクテートオキシダーゼを含む反応試薬層12を形成している。

【0020】《実施例1》図2の構成のバイオセンサを以下のようにして作製した。図1の測定極6、対極9からなる電極系上に、フェリシアン化カリウムとグルコースオキシダーゼを水に溶解させた混合水溶液を滴下し、乾燥して、グルコース反応試薬層11を形成した。また、図1の測定極7、対極10からなる電極系上にフェリシアン化カリウムとラクテートオキシダーゼを水に溶解させた混合水溶液を滴下し、乾燥して、乳酸反応試薬層12を形成した。次に、この基板1にスペーサー13およびカバー14を図1中一点鎖線で示すような位置関係をもって接着しバイオセンサを作製した。

【0021】上記のようにして作製したバイオセンサを測定装置に装着すると、測定装置はスタンバイ状態になった。続いて試料供給孔15、16に、グルコースおよびL-乳酸を含む醸造食品である日本酒を被検試料液として接触させた。被検試料液は、毛細管現象で速やかに反応試薬層11および12に供給された。反応試薬層が溶解し、反応試薬層11上では、日本酒中のグルコースのみが選択的に反応し、反応試薬層12上では、日本酒中のL-乳酸のみが選択的に反応する。このとき、反応試薬層中に共存させておいた電子受容体フェリシアン化カリウムが、酵素反応と同時に還元されてフェロシアン化カリウムに還元される。

【0022】試料を導入し、一定時間経過後、対極9を基準にして測定極6にアノード方向へ+0.5Vの定電圧を印加し、同時に、対極10を基準にして測定極7に、同様にして定電圧を印加してフェロシアン化カリウムを酸化した。そして、一定時間後に測定極6と対極9との間に流れる酸化電流値と、測定極6と対極10との間に流れる酸化電流値をそれぞれ測定し、あらかじめ求めておいた検量線に基づいて、日本酒中のグルコースおよび乳酸の濃度を算出した。このようにして、日本酒中の2つの成分が同時に精度よく定量でき、いつでも迅速、簡易に日本酒の品質の評価ができた。

【0023】《実施例2》図4の構成のバイオセンサを以下のようにして作製した。実施例1と同様にして、図3の測定極6、対極9からなる電極系上にグルコース反応試薬層11を形成し、測定極7、対極10からなる電極系上に乳酸反応試薬層12を形成した。そして、基板1に、スペーサー13およびカバー14を図3中一点鎖線で示すような位置関係をもって接着しバイオセンサを作製した。試料供給孔15、16に、被検試料として乳酸菌を培養している液体培地を接触させ、毛細管現象で速やかにグルコース反応試薬層11および乳酸反応試薬層12に供給した。

【0024】グルコース反応試薬層11上では、培地中の乳酸菌の栄養源であるグルコースのみが選択的に反応する。乳酸反応試薬層12上では、グルコースを摂取した乳酸菌の発酵によって生成したL-乳酸のみが選択的に反応する。試料を導入し、一定時間後、対極9を基準にして測定極6にアノード方向へ+0.5Vの定電圧を印加し、同时对極10を基準にして測定極7に同様にして定電圧を印加した。そして、一定時間後に測定極6と対極9との間に流れる酸化電流値と、測定極7と対極10との間に流れる酸化電流値をそれぞれ測定し、あらかじめ求めておいた検量線に基づいて、培地中のグルコースおよびL-乳酸の濃度を測定することによって、培養の進行度合いが評価でき、さらに養分の必要性の有無などを判断することができた。

【0025】

【発明の効果】上記のように、本発明によると、日本酒などの醸造食品や、菌を培養する培地など時間の経過と共に成分組成が変化する液体を迅速かつ簡便に定量して、被検試料液の評価をすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による液体の評価法の一実施例として用いたバイオセンサの反応試薬層を除いた分解斜視図である。

【図2】同バイオセンサの、スペーサーおよびカバーを除いた縦断面図である。

【図3】本発明の液体の評価法の他の実施例として用いたバイオセンサの反応試薬層を除いた分解斜視図であ

7

8

る。

【図4】同バイオセンサの縦断面図である。

【図5】従来のバイオセンサの平面図である。

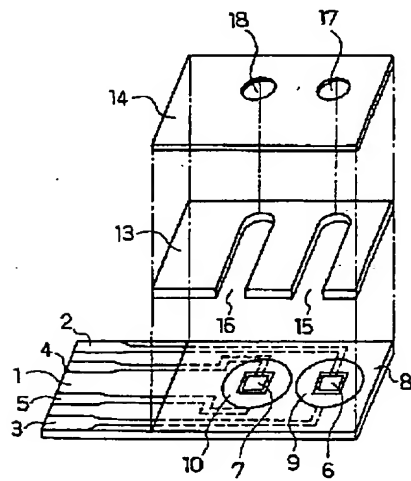
【図6】同バイオセンサの縦断面図である。

【符号の説明】

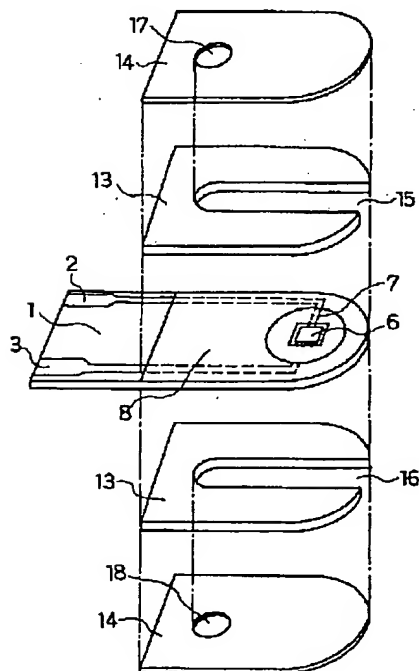
- 1 絶縁性の基板  
2、3、4、5 リード部  
6、7、19 測定極  
8 絶縁層  
9、10、20 対極

- 11 グルコース反応試薬層  
12 乳酸反応試薬層  
13 スペース  
14 カバー  
15、16 試料液導入口  
17、18 空気孔  
19 測定極  
20 対極  
21 参照極  
22 反応試薬層

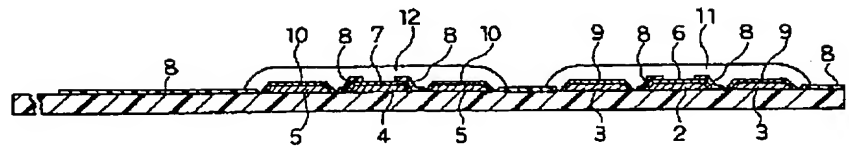
【図1】



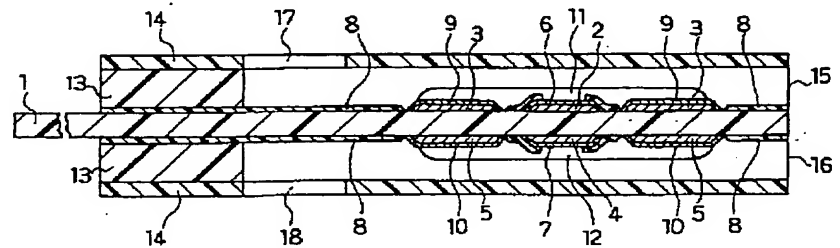
【図3】



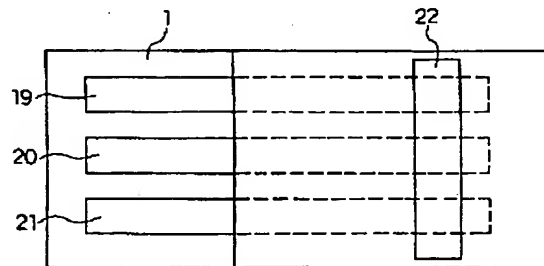
【図2】



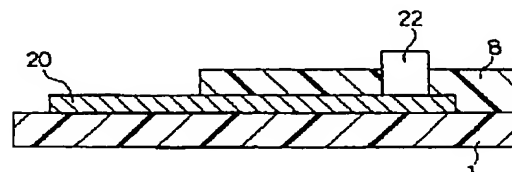
【図4】



【図5】



【図6】



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**